



(19)
 Bundesrepublik Deutschland
 Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 698 19 782 T2 2004.09.30

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 042 458 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 698 19 782.8

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/DK98/00554

(96) Europäisches Aktenzeichen: 98 959 787.7

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 99/033964

(86) PCT-Anmeldetag: 16.12.1998

(87) Veröffentlichungstag
 der PCT-Anmeldung: 08.07.1999

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 11.10.2000

(97) Veröffentlichungstag
 der Patenterteilung beim EPA: 12.11.2003

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 30.09.2004

(51) Int Cl.?: **C12N 11/02**
 C12N 11/14

(30) Unionspriorität:
 152797 23.12.1997 DK

(73) Patentinhaber:
 Novozymes A/S, Bagsvaerd, DK

(74) Vertreter:
 Patent- und Rechtsanwälte Bardehle, Pagenberg,
 Dost, Altenburg, Geissler, 81679 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:
 AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
 NL, PT, SE

(72) Erfinder:
 CHRISTENSEN, Würtz, Morten, DK-2800 Lyngby,
 DK; KIRK, Ole, DK-2830 Virum, DK; PEDERSEN,
 Christian, DK-2610 R dovre, DK

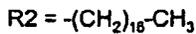
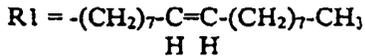
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR IMMOBILISIERUNG VON ENZYMEN

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

NZAS-0012438

[0011] Abb. 3 zeigt ein Beispiel einer durch eine Lipase katalysierten Alkohololyse, wobei ein erster Reaktant (Reaktant 1), z. B. ein Triglycerid, mit einem zweiten Reaktanten (Reaktant 2), z. B. einem Alkohol umgesetzt wird, wobei die Substituenten R1 und R2 in der Umsetzung vertauscht werden. Als Beispiel für R1 und R2 kann folgendes gelten:



ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0012] Die vorliegende Erfindung stellt ein alternatives Verfahren zur industriellen Immobilisierung von Enzymen mittels einer Standard-Mehrzweck-Verfahrensapparatur bereit, das die Kapazität erhöht und Laborkosten reduziert.

[0013] Folglich stellt die Erfindung Verfahren zur Herstellung einer Zubereitung eines immobilisierten Enzyms zur Verwendung in einem hauptsächlich organischen Medium im Wesentlichen ohne freies Wasser bereit, das in einem ersten Aspekt

- (a) Fluidisieren eines teilchenförmigen porösen Trägers in einer Wirbelschicht,
- (b) Einbringen eines enzymhaltigen flüssigen Mediums durch Zerstäubung in die Wirbelschicht, so dass das Enzym auf dem Träger adsorbiert wird, und
- (c) Entfernen von flüchtigen Bestandteilen des flüssigen Mediums von dem Träger in der Wirbelschicht

umfasst.

[0014] In einem zweiten Aspekt umfassen die Verfahren

- (a) In-Kontakt-bringen eines enzymhaltigen flüssigen Mediums mit einem teilchenförmigen porösen Träger mit einer im Wesentlichen hydrophoben Oberfläche, so dass das Enzym auf dem Träger adsorbiert wird, und
- (b) Einbringen einer teilchenförmigen hygroskopischen Substanz, so dass Agglomeration des Trägers durch Absorbieren von überschüssiger Flüssigkeit unterdrückt wird, und
- (c) Entfernen von flüchtigen Bestandteilen des flüssigen Mediums und der hygroskopischen Substanz aus dem Produkt in einer Wirbelschicht.

[0015] Schließlich umfassen die Verfahren in einem dritten Aspekt

- (a) Einbringen eines enzymhaltigen flüssigen Mediums durch Zerstäubung auf einen teilchenförmigen porösen Träger mit einer im Wesentlichen hydrophilen Oberfläche, so dass das Enzym auf dem Träger adsorbiert wird, wobei die Flüssigkeit in einer solchen Menge eingebracht wird, dass im Wesentlichen keine Agglomeration des Trägers auftritt, und
- (b) Entfernen von flüchtigen Bestandteilen des flüssigen Mediums aus dem Produkt in einer Wirbelschicht.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG Der Träger

[0016] In der Ausführungsform der Erfindung ist der Träger ein teilchenförmiges poröses Material. Die Teilchen können geeigneterweise eine diametrische Größe von 200–1000 µm, vorzugsweise 400–700 µm, einen Oberflächenbereich von 20–1000 m²/g, vorzugsweise 100–700 m²/g und eine Porengröße von 10–500 nm, vorzugsweise 100–300 nm aufweisen.

[0017] Die Trägerteilchen können ein anorganisches, organisches oder sowohl ein anorganisches als auch ein organisches Material umfassen. Der Träger kann ferner eine hydrophile oder hydrophobe Oberfläche aufweisen.

[0018] In einer ersten Ausführungsform der Erfindung umfasst der Träger ein anorganisches Material mit einer im Wesentlichen hydrophilen Oberfläche, der im Wesentlichen in hydrophilen oder hydrophoben Flüssigkeiten oder Gemischen davon unlöslich ist. Bevorzugte Träger können auf der Basis von Siliciumdioxiden (z. B. Celite von Manville, USA), Zeolithen (z. B. Wessalith MS 330 von Degussa, Deutschland), Aluminiumoxiden, Keramiken (z. B. wie in Yoshihiko Hirose et al. (Proceedings from 3rd International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations, La Grande Motte, France, 1997, S. 238) offenbart) und Kaolinen (z. B. Kaolinen, die wie in US-Patent Nr. 5,614,401 offenbart einer Säure-, Hydrothermal- und Backbehandlung unterzogen wurden) vorliegen.

[0019] In einer zweiten Ausführungsform der Erfindung umfassen die Trägerteilchen ein wie in der ersten Ausführungsform beschriebenes, hydrophiles anorganisches Material, das mit organischen Einheiten beschichtet ist und folglich eine im Wesentlichen hydrophobe Oberfläche aufweist, z. B. wie in JP 09000257-A

einer im Wesentlichen hydrophilen Oberfläche alternativ in einer Standard-Wirbelschichtapparatur, z. B. einer Uni-Glatt-Wirbelschichtapparatur (Glatt, Deutschland) durchgeführt werden, indem der trockene poröse und teilchenförmige Träger fluidisiert wird und eine enzymhaltige Flüssigkeit bei Umgebungstemperatur durch Zerstäubung zu dem fluidisierten Träger, z. B. unter Verwendung eines mit einer Pumpe (z. B. einer Standardschlauchpumpe des Typs Watson-Marlow) verbundenen Zerstäubers eingebracht wird. In dieser Ausführungsform werden Immobilisierung und Trocknen gleichzeitig durchgeführt.

Immobilisierung auf Trägern mit einer hydrophoben Oberfläche

[0027] Ohne an einer Theorie gebunden zu sein, wird erwogen, dass eine Enzymimmobilisierung auf Trägern mit einer im Wesentlichen hydrophoben Oberfläche eine Adsorption des Enzyms auf der Oberfläche einschließt. Die Immobilisierung kann ermöglicht werden, indem das Enzym Wasserstoffbindungen, Ionenbindungen oder kovalente Bindungen mit Einheiten in der Oberfläche bildet.

iii. In einer dritten Ausführungsform der Erfindung kann folglich die Enzymimmobilisierung auf einem Träger mit einer im Wesentlichen hydrophoben Oberfläche in einer Standard-Mischapparatur durchgeführt werden, wobei eine enzymhaltige Flüssigkeit zu dem porösen und teilchenförmigen Träger in einer solchen Menge eingebracht wird, dass folglich eine Paste oder eine Aufschlammung gebildet wird. Die Paste oder Aufschlammung wird für eine Zeitdauer gemischt, in welcher das Enzym adsorbiert wird. Nach dem Adsorptionsschritt wird eine hygroskopische, teilchenförmige Substanz mit einer Teilchengröße, die kleiner als der Träger ist, zu der Aufschlammung oder Paste eingebracht. Die Substanz verhindert im Wesentlichen eine Agglomeration des Enzym-Trägers durch Adsorption von überschüssiger Flüssigkeit, wodurch das anschließende Trocknen des Enzym-Träger-Produkts durch Fluidisieren des Produkts in einer Standard-Wirbelschichtapparatur, z. B. einer Uni-Glatt-Wirbelschichtapparatur (Glatt, Deutschland) ermöglicht wird, um damit flüchtige Bestandteile und gegebenenfalls die hygroskopische Substanz zu entfernen. Die hygroskopische Substanz kann eine beliebige von teilchenförmigen, fein vermahlenden, hydrophilen Bestandteilen, die überschüssige Flüssigkeit adsorbieren können, wie Siliciumdioxiden (z. B. Hyper Flow Celite), Kaolin, Aluminiumoxiden, Zeolithen oder Keramiken sein. Die Entfernung der hygroskopischen Substanz kann durch Einsetzen eines Filters mit einer geeigneten Porengröße, die den Durchgang der hygroskopischen Substanz gewährt, jedoch den Enzym-Träger zurückhält, an den oberen Teil der Wirbelschicht erzielt werden. Eine Porengröße von 100–900 µm, vorzugsweise 200–400 µm kann eingesetzt werden.

iv. In einer vierten Ausführungsform der Erfindung kann die Enzymimmobilisierung auf einem Träger mit einer im Wesentlichen hydrophoben Oberfläche alternativ in einer Standard-Wirbelschichtapparatur, z. B. einer Uni-Glatt-Wirbelschichtapparatur (Glatt, Deutschland) durchgeführt werden, wobei der trockene poröse und teilchenförmige Träger fluidisiert wird und eine enzymhaltige Flüssigkeit bei Umgebungstemperatur durch Zerstäubung zu dem fluidisierten Träger, z. B. unter Verwendung eines mit einer Pumpe (z. B. einer Standardschlauchpumpe des Typs Watson-Marlow) verbundenen Zerstäubers eingebracht wird. In dieser Ausführungsform werden Immobilisierung und Trocknen gleichzeitig durchgeführt.

Allgemeine Ausführungen für die Mischschritte i und iii

[0028] Eine Immobilisierung des Enzyms auf dem Träger in einem Mischer kann geeigneterweise bei Umgebungstemperatur durchgeführt werden. Die Mischzeiten können für diese Apparaturgröße geeigneterweise 5–60 Minuten, vorzugsweise 10–30 Minuten betragen.

Allgemeine Ausführungen für die Wirbelschichtschritte i, ii, iii und iv

[0029] Ein geeigneter Luftzufuhrstrom in die Wirbelschichtapparatur hängt von der Größe und Dichte des Enzym-Trägers, der Trägermenge und der Wirbelschichtapparatur ab. Ferner weist der Luftzufuhrstrom eine obere Grenze auf, damit der Strom dazu ausreichen sollte, dass der Träger fluidisiert bleibt, jedoch nicht so kräftig sein sollte, dass der Enzym-Träger „weggeblasen“ wird.

[0030] Geeignete Temperaturen der Luftzufuhr zum Entfernen von flüchtigen Bestandteilen hängt in erster Linie von der Wärmestabilität des Enzyms (der Inaktivierungstemperatur) ab. Die Temperatur kann 40–90°C, vorzugsweise 50–70°C, z. B. 60°C betragen. Eine höhere Temperatur stellt kürzere Immobilisierungs- und Trocknungszeiten bereit.

[0031] Ferner hängt der Zeitverbrauch für die Immobilisierung und/oder Trocknung des Enzym-Trägers, wenn Apparatur, Luftzufuhr und Lufttemperatur festgelegt sind, von der Menge des Enzym-Trägers ab. Das Immobilisierungs-/Trocknungsverfahren kann durch Messen der Luftzufuhrtemperatur und der Luftaustrittstemperatur überwacht werden. Während der Enzym-Träger feucht ist, ist die Luftaustrittstemperatur aufgrund der Wärmeabsorption und dem Abdampfen von flüchtigen Bestandteilen niedriger als die Zufuhrtemperatur. Typischerweise erfolgt während des Immobilisierungs-/Trocknungsverfahrens ein dauerhaftes Abdampfen, wobei sich

wurden aus der verschlossenen unter Verwendung einer Spritze bei T = 0, 10, 20, 30, 40, 50 und 60 Minuten entnommen. Die Proben wurden mit einem Gemisch von 50/50 Vol.-% aus Aceton/Acetonitril verdünnt (1 : 5 Vol : Vol) und auf einem HPLC-System analysiert.

Analyse auf dem HPLC-System

(d) Das HPLC-System wurde mit einer an den Enden verschlossenen Säule des Typs LiChrosphere 100 RPC18 mit 5 µm (125 × 4 mm) (Merck) ausgestattet. Eine isokratische 50/50 Vol.-%ige Acetonitril/Aceton-Lösung wurde als mobile Phase mit einem Fluss von 1 ml/Minute ausgewählt.

(e) 20 µl Probe wurden injiziert und die gebildeten Produkte (1,2-Dilauroyl-3-myristoylglycerin (Produkt 1) und 1,3-Dimysteoyl-2-lauroylglycerin (Produkt 2)) durch Verdampfungslichtstreuungsbestimmung (Sedex 55, Sedere, Frankreich) bei einem Druck von 2 Bar und einer Temperatur von 30°C gemessen.

(f) Die Mengen der gebildeten Produkte wurden durch Vergleichen der Probemessungen mit externen Standardkurven von 1,2-Dilauroyl-3-myristoylglycerin und 1,3-Dimysteoyl-2-lauroylglycerin bestimmt.

[0044] Die Geschwindigkeit des Umesterungsverfahrens kann in Einheiten berechnet werden, wobei 1 Einheit als 1 µmol in Trilaurin pro Minute eingebrachte Myristinsäure definiert ist.

[0045] In einer anderen Ausführungsform kann die Wirkung des Umesterungsverfahrens %uale Umwandlung von Trilaurin zu Produkt 1 und Produkt 2 angegeben werden, was durch

$$\%uale\ Umwandlung_{T=i} = \frac{\left[\text{mol Produkt 1} + \text{mol Produkt 2} \right]_{T=i}}{\text{mol Trilaurin bei } T = 0} \times 100\%$$

berechnet wird, wobei i angibt, bei welcher Zeit die Probe von der Inkubationsflasche entnommen wird (Schritt c).

Beispiel 1

Lipaseadsorption auf einem Träger auf Zeolith-Basis in einer Wirbelschicht mit gleichzeitiger Entfernung/Abdampfung von flüchtigen Flüssigkeiten

[0046] 400 g einer Lösung einer Lipase von *Humicola lanuginosa* (693 kLU/ml) wurde auf 1 kg Zeolith (Wessalith MS330; 0,5–0,9 mm; Degussa, Deutschland) unter Verwendung eines Zweibege-Zerstäubers in einer Uni-Glatt-Wirbelschichtapparatur (Glatt, Deutschland) zerstäubt. Die Lipaselösung wurde über eine Schlauchpumpe (Watson-Marlow) aufgebracht. Die Luftzufuhrtemperatur betrug 60°C und die Produkttemperatur 40°C mit einem Luftstrom von 100 m³/Stunde. Nach Beendigung der Immobilisierung wurde das Produkt für eine zusätzliche Dauer von 5 Min. in der Wirbelschicht getrocknet.

[0047] Das Immobilisierungsverfahren wurde im Umesterungsversuch getestet, wodurch eine 53%ige Umwandlung von Trilaurin nach T = 24 Stunden gemessen wurde.

Beispiel 2

Lipaseadsorption auf einem Träger auf Siliciumdioxid-Basis in einer Wirbelschicht mit gleichzeitiger Entfernung/Abdampfung von flüchtigen Flüssigkeiten

[0048] 94 g einer Lösung einer Lipaségärlösung von *Humicola lanuginosa* (693 kLU/ml) wurden mit 100 g demineralisiertem Wasser verdünnt und auf 200 g Celite R648 (Manville, USA) unter Verwendung eines Zweibege-Zerstäubers (betriebsintem hergestellt) in einer Uni-Glatt-Wirbelschichtapparatur (Glatt, Deutschland) zerstäubt. Die Lipaselösung wurde über eine Schlauchpumpe (Watson-Marlow) (Fließgeschwindigkeit 238 g/Stunde) aufgebracht. Die Luftzufuhrtemperatur und die Produkttemperatur waren mit denjenigen, die in Beispiel 1 angegeben sind, identisch. Nach Beendigung der Immobilisierung wurde das Produkt für eine zusätzliche Dauer von 5 Min. in der Wirbelschicht getrocknet.

[0049] Das Immobilisierungsverfahren wurde im Umesterungsversuch getestet, wodurch eine 12%ige Umwandlung von Trilaurin nach T = 24 Stunden gemessen wurde.

Gemischen davon unlöslich und mit organischen Einheiten beschichtet ist, so dass eine im Wesentlichen hydrophobe Oberfläche bereitgestellt wird, oder

(3) einem organischen Polymerharz,

In einer Wirbelschicht,

(b) Einbringen eines enzymhaltigen flüssigen Mediums durch Zerstäubung in die Wirbelschicht, so dass das Enzym auf dem Träger fixiert wird, und

(c) Entfernen von flüchtigen Bestandteilen des flüssigen Mediums von dem Träger in der Wirbelschicht.

2. Verfahren zur Herstellung einer Zubereitung eines immobilisierten Enzyms zur Verwendung in einem hauptsächlich organischen Medium ohne freies Wasser, umfassend:

(a) In-Kontakt-bringen eines enzymhaltigen flüssigen Mediums mit einem teilchenförmigen porösen Träger, der im Wesentlichen in hydrophilen oder hydrophoben Flüssigkeiten oder Gemischen davon unlöslich ist, mit einem Oberflächenbereich von 20–1000 m²/g, einer Teilchengröße von 200–1000 µm und einer hydrophoben Oberfläche, so dass das Enzym auf dem Träger adsorbiert wird, und

(b) Einbringen einer hygroskopischen Substanz, so dass die Agglomeration des Trägers durch Absorbieren von überschüssiger Flüssigkeit unterdrückt wird, und

(c) Entfernen von flüchtigen Bestandteilen des flüssigen Mediums und der hygroskopischen Substanz aus dem Produkt in einer Wirbelschicht.

3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Flüssigkeit in solch einer Menge eingebracht wird, dass im Wesentlichen keine Agglomeration des Trägers auftritt.

4. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das anorganische Material von Schritt (1) ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Siliciumdioxiden, Zeolithen, Aluminiumoxiden und Kaolinen.

5. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das anorganische Material von Schritt (2) ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Siliciumdioxiden, Zeolithen, Aluminiumoxiden und Kaolinen, die mit organischen Einheiten beschichtet sind, um eine hydrophobe Oberfläche bereitzustellen.

6. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das organische Polymerharz von Schritt (3) ein Adsorptionsharz ist.

7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei das Adsorptionsharz ein Polyacrylat, ein Polymethacrylat, ein mit Divinylbenzol vernetztes Polystyrol, ein Polyurethan oder ein Polypropylen ist.

8. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das organische Polymerharz von Schritt (3) ein Ionenaustauscherharz, vorzugsweise ein Anionenaustauscherharz, besonders bevorzugt ein schwach basisches Anionenaustauscherharz ist.

9. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das flüssige Medium ein wässriges Medium ist.

10. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Enzym eine Lipase ist.

11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei die Lipase von einem Stamm der Gattung *Humicola* (auch bekannt als *Thermomyces*), *Pseudomonas*, *Candida* oder *Rhizomucor*, vorzugsweise der Spezies *H. lanuginosa* (auch bekannt als *Thermomyces lanuginosa*), *C. antarctica* oder *R. miehi* abgeleitet ist.

12. Verfahren zur enzymatischen Modifizierung einer organischen Verbindung, umfassend das In-Kontakt-Bringen der organischen Verbindung mit einem immobilisierten Enzym, das durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 1–11 hergestellt wurde, in einem Reaktionsmedium im Wesentlichen ohne freies Wasser.

13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei die Modifizierung eine Umesterungsreaktion, umfassend das In-Kontakt-Bringen eines ersten Reaktanten, der ein Fettsäureester ist, eines zweiten Reaktanten, der ein anderer Fettsäureester ist, eines Alkohols oder einer freien Fettsäure mit der immobilisierten Lipase, ist.

14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei der erste Reaktant ein Triglycerid ist.

15. Verfahren nach den Ansprüchen 13 und 14, wobei der zweite Reaktant ein Fettsäureester und die Lipase positionell spezifisch ist.

16. Verfahren nach Anspruch 13, wobei der erste und der zweite Reaktant verschiedene Triglyceride oder

